

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19) Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: 0 424 293 A1

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90420453.4

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: C12Q 1/04, C12Q 1/18,  
C07D 265/38

(22) Date de dépôt: 18.10.90

(30) Priorité: 20.10.89 FR 8914087

(43) Date de publication de la demande:  
24.04.91 Bulletin 91/17

(84) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: BIO MERIEUX Société anonyme  
dite:  
Marcy l'Etoile  
F-69260 Charbonnières les Bains(FR)

(72) Inventeur: Monget, Daniel  
24 Résidence du Moulin  
F-01150 Saint Sorlin en Bugey(FR)

(74) Mandataire: Guerre, Dominique et al  
Cabinet Germain et Maureau 20 Boulevard  
Eugène Deruelle BP 3011  
F-69392 Lyon Cédex 03(FR)

### (54) Procédé et réactifs pour la détection de micro-organismes.

(57) La présente invention concerne des réactifs pour la détection de micro-organismes.

Selon l'invention, on utilise dans un milieu réactionnel en phase aqueuse contenant une source de carbone et une source d'azote, un marqueur constitué par la résorufine, ou tout composé ayant une structure chimique similaire.

L'invention s'applique notamment à l'identification de micro-organismes, à l'obtention d'antibiogrammes et antifongigrammes.

EP 0 424 293 A1

## PROCEDE ET REACTIFS POUR LA DETECTION DE MICRO-ORGANISMES

La présente invention concerne de manière générale la détection de micro-organismes, dans différents milieux ou sur différents substrats, pour différentes fins ou applications, telles que l'identification ou la détection microbienne.

Plus précisément, l'invention s'intéresse aux réactifs, comprenant un milieu réactionnel en phase aqueuse, lequel contient au moins une source de carbone, ainsi qu'un marqueur luminescent dont une émission lumineuse est modifiable en conséquence du développement ou du métabolisme du micro-organisme à détecter, introduit dans le milieu réactionnel.

Par micro-organisme, on entend notamment les microbes, bactéries, et levures.

Par "émission lumineuse", on entend tout rayonnement lumineux émis sous l'effet d'une excitation extérieure, notamment lumineuse, dans le domaine du visible ou non, susceptible d'être modifiée par le développement du micro-organisme dans le milieu réactionnel, et d'être observée, contrôlée ou mesurée par tous moyens de détection optique, dont la simple observation à l'oeil nu. Ressortent de cette définition, différentes propriétés lumineuses, telles que la luminescence, la fluorescence, la phosphorescence, visibles ou non à l'oeil nu par exemple.

Depuis de nombreuses années, les fabricants et professionnels des réactifs ou méthodes de détection de micro-organismes sont à la recherche d'une solution présentant ensemble les caractéristiques essentielles suivantes :

- avoir un caractère universel, c'est-à-dire indépendante du type ou de l'espèce des micro-organismes recherchés
- être实质iellement indépendante de la nature du milieu ou du substrat dans lequel les micro-organismes sont recherchés
- présenter une grande sensibilité.

Aucune des méthodes disponibles à ce jour, y compris les plus récentes, ne permet de répondre à toutes ces exigences, comme montré et détaillé ci-après.

Une première méthode, et c'est la plus simple, consiste à prélever un échantillon, à éventuellement diluer ce dernier de manière successive, et à appliquer l'échantillon obtenu à la surface d'un milieu nutritif gélosé. Après incubation pendant 24 à 48 heures, on procède par des moyens manuels ou vidéo, au contrôle de la présence des micro-organismes, et éventuellement à leur comptage. La technique consistant à immerger directement dans le milieu contrôlé des lames imprégnées avec un milieu nutritif, et à contrôler, après incubation, la présence de micro-organismes sur ces lames, constitue en fait une variante de cette première méthode.

Une telle solution est peu sensible, et peu fiable, en particulier lorsque des moyens de contrôle vidéo sont utilisés. Une telle méthode nécessite également d'adapter ou choisir le milieu nutritif, en fonction des micro-organismes recherchés.

Une deuxième méthode, assez proche de la première, consiste à pigmenter ou colorer l'échantillon prélevé, ou provoquer sa fluorescence, avec toutes substances appropriées telle que l'acridine orange, puis à observer directement l'échantillon ainsi traité, par exemple au microscope. Pour l'essentiel, une telle méthode présente des inconvénients comparables à ceux de la première méthode ; en particulier, une telle solution demeure manuelle, et son automatisation apparaît difficile.

Une troisième méthode consiste à prélever un échantillon, et à mettre en culture ce dernier pendant un temps prédéterminé, puis à observer le milieu de culture par néphéломétrie ou turbidimétrie. En d'autres termes, la présence de micro-organismes est révélée par l'opacité du milieu de culture. Une telle méthode apparaît assez peu sensible, et l'opacité observée ne résulte pas uniquement de la présence des micro-organismes, de telle sorte que cette solution n'apparaît pas utilisable ou exploitable pour des milieux biologiques complexes, par exemple des échantillons de sang.

Différentes méthodes plus élaborées, par voie biochimique, et faisant appel à la colorimétrie ou la fluorimétrie, ont été proposées pour détecter des micro-organismes.

Une quatrième méthode consiste à mettre en présence un échantillon à contrôler et un réactif comprenant un hydrate de carbone comme le glucose, et un indicateur de pH. Comme le développement, ou le métabolisme du micro-organisme génère des acides, ceux-ci modifient la coloration de l'indicateur de pH. Une telle solution s'avère assez peu sensible, et n'a pas en tout cas un caractère universel.

Une cinquième méthode consiste à mettre en présence un échantillon à contrôler, et un indicateur chromogène d'oxydo-réduction, tel qu'un sel de tétrazolium. Les mécanismes biochimiques de la chaîne respiratoire des micro-organismes présents génèrent des substances réductrices telles que NADH (Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide Hydrogéné) ; cette substance réductrice conduit à la réduction de

l'indicateur, et donc à sa modification de couleur. Une telle méthode est assez peu sensible, et en particulier les sels de tétrazolium doivent être utilisés en grande quantité. On notera ainsi que ces derniers sont toxiques et précipitent facilement.

Une sixième méthode consiste à utiliser des substrats enzymatiques de synthèse, chromogéniques ou fluorogéniques. La présence de certaines enzymes, liées au développement des micro-organismes, conduit à couper le substrat enzymatique en deux, et à libérer la partie chromogène ou fluorogène, laquelle peut être alors détectée.

Une telle méthode ne présente pas de caractère universel, en ce sens que le substrat enzymatique doit être à chaque fois adapté au type de micro-organisme recherché ; en particulier, il n'existe pas une seule et même enzyme commune à tous les micro-organismes. Par ailleurs, pour des milieux biologiques complexes, tels que le sang ou l'urine, contenant déjà des enzymes, cette méthode ne permet pas de distinguer ceux spécifiques aux micro-organismes, par exemple bactéries ou microbes, dont on recherche la présence.

Une septième méthode consiste à détecter les micro-organismes, par l'intermédiaire du métabolite ATP (Adénosine-Tri-Phosphate), en présence d'un substrat luciférine, et par oxydation de ce dernier en présence de luciférase, laquelle conduit à la bioluminescence du substrat précité. Une telle méthode présente pour l'essentiel les mêmes inconvénients que ceux énoncés pour la méthode précédente.

Une huitième méthode procède par la mise en évidence du gaz carbonique produit par les micro-organismes, en présence d'une ou plusieurs sources de carbone dans le milieu réactionnel ; une telle technique est par exemple utilisée en hémoculture pour déceler une présence microbienne. La détection du gaz carbonique peut être radiométrique, auquel cas on doit utiliser une source de carbone marquée au C 14, ou spectro-photométrique dans l'infra-rouge. On peut aussi mesurer la production de gaz carbonique par le contrôle de l'augmentation de pression dans un système fermé, à l'aide d'un manomètre ou d'un capteur de pression approprié. Une telle méthode est assez peu sensible, et dans le cas d'un marqueur radio-actif, elle pose différents problèmes de sécurité et agrément administratif préalable du laboratoire de mesure.

Une dernière méthode consiste à détecter les micro-organismes, par l'intermédiaire de l'évolution des paramètres électriques du milieu réactionnel dans lequel les micro-organismes se développent ; ces paramètres étant notamment l'impédance, la conductance ou la capacité. Sur la base de cette méthode, différents bio-capteurs ont été développés et mis sur le marché, notamment dans le domaine agro-alimentaire. Une telle technique est assez peu sensible, en particulier vis-à-vis des exigences de diagnostic médical. Et les matériels disponibles actuellement selon cette solution sont assez peu performants.

Au terme de cette analyse des solutions antérieures en matière de détection de micro-organisme, on observera au passage que certaines de ces méthodes procèdent par échantillonnage, c'est-à-dire le prélèvement d'un échantillon sur le milieu ou sur le substrat à contrôler, la culture de cet échantillon, et éventuellement le prélèvement à intervalles réguliers du milieu de culture. De telles opérations, en général effectuées de manière manuelle, paraissent difficilement automatisables.

La présente invention a pour objet un réactif pour la détection de micro-organismes, avec marqueur luminescent, obviant la plupart des inconvénients observés précédemment. Plus précisément, la présente invention a pour objet un réactif et une méthode de détection correspondante, permettant à la fois :

- une détection des micro-organismes directement sur le milieu ou l'échantillon à contrôler,
- une automatisation accessible, compte-tenu de la simplicité du procédé d'analyse retenu
- un caractère universel, c'est-à-dire substantiellement indépendant du milieu dans lequel on recherche les micro-organismes, et de la nature ou espèce de ces derniers
- une bonne sensibilité, en particulier une détection sous des concentrations relativement faibles

Grâce à la découverte expérimentale exposée ci-après, on a trouvé un réactif répondant à l'ensemble des exigences précédentes.

Cette procédure expérimentale a été la suivante :  
Sous l'action de la  $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli*, cultivée dans un bouillon approprié, il est possible de couper le substrat 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ D glucuronide, de libérer ainsi la 4-méthylumbelliféronne fluorescente, et donc détecter la bactérie précitée.

## 55 1<sup>ère</sup> expérience

En remplaçant le substrat 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ D-glucuronide par le substrat résorufine- $\beta$ D-glucuronide pour la recherche de la  $\beta$ -glucuronidase d'*E. coli*, dans le même bouillon, on a constaté que bien que le

nouveau substrat soit hydrolysé au cours de la croissance bactérienne en ampoule, la fluorescence rose de la résorufine ne s'exprime pas ; on obtient tout au plus un liseret rose à l'interface bouillon/atmosphère gazeuse, alors que la résorufine est soluble en milieux aqueux.

5

## 2ème expérience

Dans des ampoules stériles contenant le même bouillon que précédemment, on introduit de la résorufine libre à la concentration de 20 micromoles/litre. Les ampoules sont ensuiteensemencées par 10 différentes souches bactériennes d'entérobactéries, à raison de  $10^6$  bactéries/ml.

Au départ, le bouillon est rose dans toutes les ampoules (fluorescence de la résorufine). Au-delà de 4 heures d'incubation à 37° C, le milieu des ampoules montrant une croissance est décoloré (avec parfois un liseret rose en surface), alors que le témoin sans bactérie reste rose.

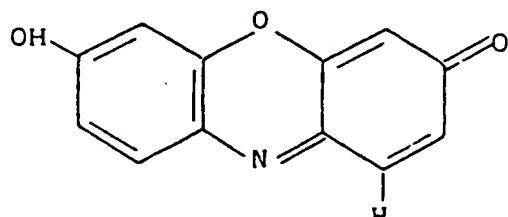
15

## CONCLUSION DE CES DEUX EXPERIENCES

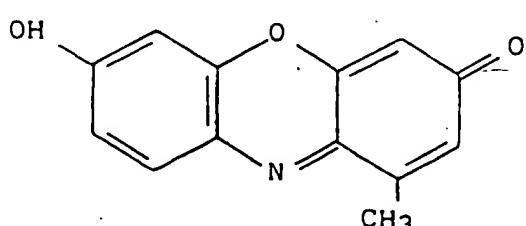
- La croissance bactérienne en bouillon en présence de résorufine entraîne la disparition de la fluorescence de ce marqueur.  
20 - Bien que la nature de la réaction en question ne puisse être identifiée avec certitude, la résorufine apparaît être un excellent indicateur de la croissance bactérienne.

A partir de cette découverte, la présente invention propose tout d'abord un réactif pour la détection de micro-organismes, comprenant un milieu réactionnel en phase aqueuse, contenant au moins une source de 25 carbone et une source d'azote, ainsi qu'un marqueur fluorescent, constitué par la résorufine ou l'orcirufine, ou toutes formes anioniques de ces composés chimiques. Ces deux produits répondent aux formules exprimées respectivement ci-après :

30



35



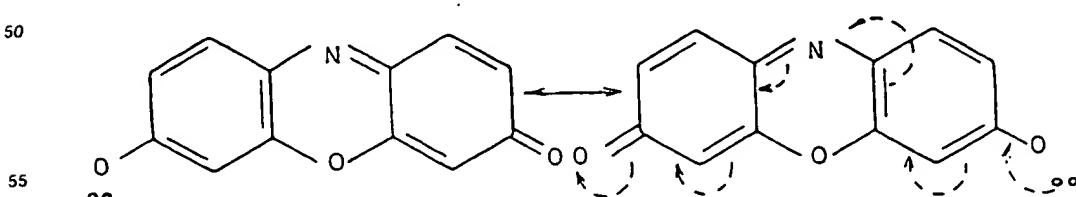
40

45

Comme la fluorescence des marqueurs précités a pour origine une délocalisation électronique importante entre les positions 3 et 7, générant un hybride de résonnance selon la formule suivante :

50

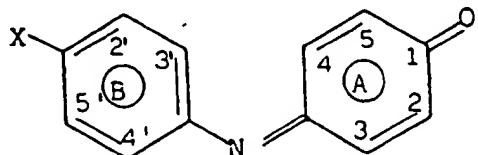
55



la présente invention s'est intéressée à titre de marqueur, aux structures chimiquement proches, répondant aux deux formules générales ci-après, et présentant également des propriétés de fluorescence, utilisables dans le cadre d'un réactif selon l'invention, pour la détection de micro-organismes.

Il s'agit tout d'abord des composés chimiques répondant à la formule suivante, sous forme neutre ou 5 anionique :

10



15

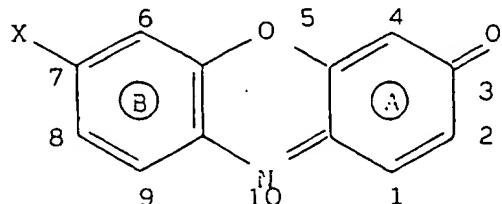
dans laquelle :

- les positions (2'), (4') et (5') sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide, cyano,
- 20 - un groupement oxy relie entre elles les positions (3') et (4)
- les positions (2), (3) et (5) sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide et cyano, ou les positions (2) et (3) appartiennent en commun au noyau (A) et à un noyau insaturé
- 25 - X est une fonction hydroxyle ou amine.

Il s'agit ensuite des composés chimiques, sous forme neutre ou anionique, répondant à la formule suivante :

30

35



- 40 - dans laquelle les positions (6, 8, 9) sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylique, amide et cyano
- dans laquelle les positions (1) et (4) sont occupées chacune par un atome ou substituant choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène, le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide et cyano ; ou les positions (1) et (2) appartiennent en commun au noyau (A) et à un noyau insaturé
- 45 - X est une fonction hydroxyle ou amine.

Des composés répondant à cette dernière formule générale, ainsi que leur mode d'obtention sont précisés dans le tableau ci-après.

50 Selon la présente invention, les conditions suivantes sont mises en oeuvre :

- le pH du milieu réactionnel est compris entre 6,0 et 8,0
- l'indicateur ou marqueur est contenu dans le milieu réactionnel.

55

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

Substituant nom du composé	X	1	2	4	6	8	9	OBTENTION
Résorufine	OH	H	H	H	H	H	H	Condensation quinone-monochloroimine (2) avec résorcinol ; ou réduction puis oxydation à l'air de résazurine (3) ; ou chauffage résorcinol, nitrobenzène et acide sulfurique ; neutralisation puis extraction à l'éthanol
Orcirufine	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	Condensation quinone-monochloroimine (2) avec orcinol
Résorufamine	NH <sub>2</sub>	H	H	H	H	H	H	Condensation N,N'-dichloroquinone dimine (1) et résorcinol
Orcirufamine	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	Condensation N,N'-dichloroquinone dimine (1) et orcinol
Méthylorcirufine	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>		Réaction en solution éther d'orcinol avec l'acide nitrique fumant, pour obtenir diméthyl-resazurine ; réduction puis oxydation à l'air de la diméthyl-resazurine
Pentylrésorufine	OH	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	H	H	H	H	idem méthylorcirufine, à partir d'olivetol (5-pentylresorcinol)
2-Chlororésorufine	OH	H	C <sub>1</sub>	H	H	H	H	idem méthylorcirufine, mais à partir du 4-chlororésorcinol
6,8-Dichloro-1-méthyl-résorufine	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	H	Condensation réactif (4) de Gibbs avec orcinol

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

nom du substituant composé	X	1	2	4	6	8	9	OBTENTION
6,8-Dibromo-1-Méthyl résorufine	OH	CH <sub>3</sub>	H	Br	Br	H		Condensation réactif (4) de Gibbs avec orcinol
3-Méthoxy-Résorufine	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H		Idem méthylorcirufine, mais à partir du 5-méthoxy-résorcinol
2-Carboxyl-Résorufine	OH	H	CO <sub>2</sub> H	H	H	H		Condensation quinone-monochloroimine (2) avec acide $\beta$ -résorcinique (acide 2,4-dihydroxybenzoïque)
Naphto-Résorufine	OH			H	H	H	H	Condensation N-chloroquinone monoimine (2) avec naphto-résorcinol
4-Méthyl-résorufine	OH	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H		Condensation
2,4,6,8-tétrabromo-résorufine	OH	H	Br	Br	Br	H		Halogénéation directe de la résorufine (ou orcirufine)
2,4,6-Tétrachloro-résorufine	OH	H	Cl	Cl	Cl	H		Halogénéation directe de la résorufine (ou orcirufine)

5

10

15

20

25

30

35

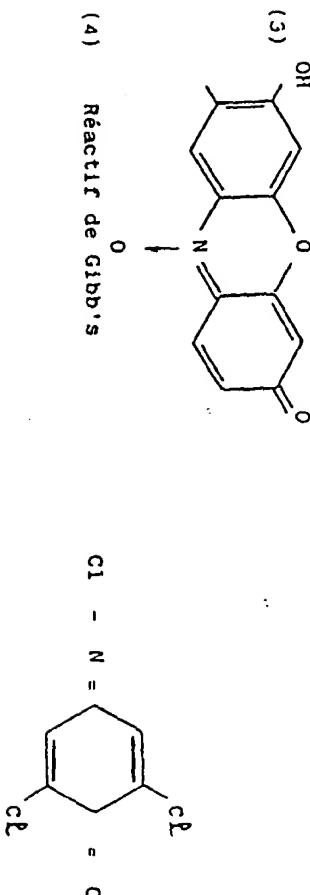
40

45

50

(4)

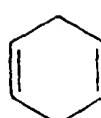
Réactif de Gibbs's



(1)

 $\text{O} - \text{N} = \text{O}$  $= \text{N} - \text{Cl}$ 

(2)

 $\text{Cl} - \text{N} = \text{O}$  $= \text{O}$ 

Obtenus à partir du p-aminophenol  
selon Willstätter et Mayer, IICR (1904)  
37,1498 et suivantes

à raison de 0,01 mg/l à 100 mg/l, et de préférence de 1 à 10 mg/l  
sa source d'azote du milieu réactionnel peut être de toute nature, par exemple peptone ou sulfate d'ammonium  
la source de carbone peut être de tous types, telle que glucose, lactose, ou autres

S'agissant du milieu réactionnel, contenant les sources d'azote et de carbone nécessaires aux réactifs,  
la majorité des bouillons commercialisés peuvent convenir, par exemple trypticase-soja, cœur-cerv IIe.

etc...

Un procédé de détection conforme à l'invention consiste à mettre en oeuvre les étapes suivantes :  
1) Le réactif, comprenant comme précédemment le milieu reactionnel et le marqueur selon l'invention est préparé, réparti en flacons ou ampoules, ou toutes autres formes de conditionnement, et stérilisé par filtration ou autoclave.

- 5 2) Le réactif est mélangé à l'échantillon, milieu, ou substrat à contrôler.  
3) Le mélange obtenu est incubé entre 20° et 65°, pendant un temps compris entre 1 minute et 7 jours, par exemple.  
10 4) la fluorescence du marqueur est mesurée à intervalles réguliers, à l'aide d'un fluorimètre, ou simplement appréciée à l'oeil nu.

La diminution de la fluorescence, voire son extinction totale, traduit la présence de micro-organismes dans l'échantillon ou substrat contrôlé.

La présente invention est maintenant décrite et détaillée, quant aux expériences effectuées, par rapport à la résorufine. Ce marqueur, apporte en outre les avantages supplémentaires et importants suivants :

- 15 - ce produit n'est pas toxique  
- il présente une grande sensibilité, autorisant son emploi à des concentrations très faibles, de l'ordre de 1 à 2 mg/l  
- et surtout, s'agissant de la fluorescence, les longueurs d'ondes maximum d'excitation et d'émission se situent respectivement à 572 nm et 585 nm ; ces longueurs d'ondes se situent au-delà des radiations absorbées par la plupart des milieux ou échantillons analysés, tout en restant dans le domaine du visible,  
20 ce qui permet d'observer de manière séparée la fluorescence spécifique à la résorufine, sans interférence ou gêne du milieu ambiant.

#### 25 Exemple 1 : Préparation du réactif

Le milieu réactionnel est préparé en mélangeant les ingrédients suivants :

30	- bouillon Mueller Hinton déshydraté (Difco, réf 0757-01) - glucosé (Merck, réf 8337) - résorufine (Aldrich, réf 23015-4) - eau distillée - pH	21 g 5 g 2 mg 1000 ml 7,3
----	--	---------------------------------------

35

Ce milieu est réparti en tubes de verre avec bouchons à vis, à raison de 6 millilitres par tube, et autoclavé à 121° C pendant 15 minutes.

Les tubes stérilisés sont conservés à l'obscurité, la résorufine étant sensible à la lumière.

- 40 Ce milieu sera utilisé dans les exemples d'applications 2 à 4 selon la méthode générale suivante : après avoir ajouté le ou les différents éléments spécifiques à l'application considérée, les tubes vissés sont agités dans une étuve sur un agitateur Vibratest réglé à 100 tours/minute. La mesure de la fluorescence est effectuée à l'aide d'un fluorimètre LKB type LS - 5B. Les tubes sont introduits directement dans le porte-cuves. La longueur d'ondes d'excitation est réglée à 572 nm et celle d'émission à 585 nm. Il est à noter que dans l'exemple 4, le glucose présent dans le milieu réactionnel peut être remplacé par d'autres sucres.

#### Exemple 2 : Application à l'hémoculture

50 Dans 7 tubes de verre contenant le réactif préparé selon l'exemple 1, il est ajouté du sang frais humain stérile, à raison de 1 millilitre par tube.

Le premier tube est utilisé comme témoin et les 6 autres sontensemencés par l'une des 6 souches microbiennes suivantes :

- 55 - Ec = Escherichia coli  
- Cf = Citrobacter freundii  
- Pa = Pseudomonas aeruginosa  
- Sa = Staphylococcus aureus  
- Ef = Enterococcus faecalis

- Ca = Candida albicans

La quantité de micro-organismes introduite au départ dans chaque tube est de 100 cellules viables par millilitre de milieu. Cet inoculum est contrôlé par comptage des colonies formées à la surface d'une gélose au sang après 24 heures d'incubation.

5 La mesure de la fluorescence est effectuée après 12 h, 24 h, 36 h et 48 h d'incubation à 35° C. L'intensité de la fluorescence est reportée dans le tableau ci-dessous. L'extinction partielle ou totale de la fluorescence témoigne de la présence de cellules microbiennes dans les échantillons de départ

10

	Souche : témoin : Incubat : négatif	Ec	Cf	Ps	Sa	Ef	Ca
15	12 H :	463	11	454	465	447	459 : 461
	24 H :	465	9	10	464	460	126 : 460
20	36 H :	458	8	10	53	27	13 : 461
	48 H :	464	9	9	17	13	18 : 19

25

Pour cette application, il est préférable d'utiliser un bouillon spécifique à l'hémoculture, à la place du bouillon Mueller-Hinton.

30

### Exemple 3 : Application à l'antibiogramme

6 antibiotiques différents sont introduits dans des tubes préparés comme indiqué dans l'exemple 1. Chaque antibiotique est utilisé aux 2 concentrations "c" et "C" indiquées dans le tableau ci-après. Des tubes sans antibiotique sont utilisés comme témoins.

Chaque couple de tubes correspondant à un antibiotique aux 2 concentrations "c" et "C" est ensemencé par l'une des 3 souches microbiennes suivantes, à raison de 10 cellules viables par millilitre :

- Ec = Escherichia coli ATCC 25922
- 40 - Pa = Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- Sa = Staphylococcus aureus ATCC 25923

La mesure de la fluorescence est effectuée après 18 heures d'incubation à 35° C. L'intensité de la fluorescence est reportée dans le tableau ci-dessous.

- Les résultats sont symbolisés selon :
- 45 - S = souche sensible = fluorescence maximale
  - R = souche résistante = extinction totale de la fluorescence
  - I = souche intermédiaire = extinction partielle de la fluorescence
- L'antibiogramme est contrôlé par la technique de la dilution en gélose.

50

55

	Antibiotique	Concentration en $\mu\text{g} / \text{ml}$	Ec	Pa	Sa
5	Témoin	c = 0 C = 0	8 7	10 11	9 11
10	Pénicilline	c = 0,25 C = 16	9 R 8	10 R 9	455 S 457
15	Pipéracilline	c = 32 C = 128	460 S 465	463 S 450	459 S 468
20	Céfoxitone	c = 8 C = 32	439 S 463	15 R 9	448 S 457
25	Rénamycine	c = 2 C = 16	15 I 458	13 R 10	438 S 447
	Trétracycline	c = 1 C = 4	451 S 465	15 R 19	443 S 459
	Erythromycine	c = 1 C = 4	8 R 10	11 R 13	445 S 460

30 L'antibiogramme selon l'invention peut être réalisé en cupules miniaturisées (plaqué de microtitration).

#### Exemple 4 : Application

35 L'utilisation de 7 différents sucres par 8 souches microbiennes à des fins d'identification est présentée dans cet exemple :

Les 7 sucres testés sont :

- Glucose (GLU)
- Maltose (MAL)
- Saccharose (SAC)
- 40 - Lactose (LAC)
- Cellobiose (CEL)
- Tréhalose (TRE)
- Mélibiose (MEL)

45 Les tests sont pratiqués dans le réactif en tubes de verre, préparé comme indiqué dans l'exemple 1. Le glucose contenu dans ce milieu est remplacé le cas échéant par le sucre correspondant, à la même concentration de 5 g/l.

La batterie de tubes estensemencée par les 8 souches suivantes :

- Ca = Candida albicans
- Ct = Candida tropicalis
- 50 - Tg = Torulopsis glabrata
- Ec = Escherichia coli
- Kp = Klebsiella pneumoniae
- Pv = Proteus vulgaris
- Ah = Aeromonas hydrophila
- 55 - Va = Vibrio alginolyticus

Pour chaque souche, une suspension est réalisée en sérum physiologique, ajustée au point 2 de l'échelle de McFarland. 200 microlitres de cette suspension sont introduits dans les 7 tubes contenant chacun des sucres.

La mesure de la fluorescence est effectuée après 18 heures d'incubation à 350 °C. L'intensité de la fluorescence est reportée dans le tableau ci-dessous. Les résultats sont symbolisés en :

- réaction négative ... (-) = fluorescence maximale

- réaction positive... (+) = extinction de la fluorescence

Les résultats obtenus sont contrôlés à l'aide de microméthodes commercialisées avec les tests commercialisés sous la marque API par la société BIO MERIEUX, sous les noms : API 20 E, API 20 C, API 50 CH.

	Sucre	GLU	MAL	SAC	LAC	CEL	TRE	NEL
10	Souche	:	:	:	:	:	:	:
15	Ca	:	31	25	37	466	453	19
		:	+	+	+	-	-	+
20	Ct	:	12	17	21	441	16	20
		:	+	+	+	-	+	+
25	Tg	:	12	456	447	452	449	16
		:	+	-	-	-	-	+
30	Ec	:	9	13	459	10	454	10
		:	+	+	-	+	-	+
35	Kp	:	10	9	9	11	8	10
		:	+	+	+	+	+	+
	Pv	:	9	469	10	458	461	437
		:	+	+	+	-	-	-
40	Ah	:	10	14	11	451	467	12
		:	+	-	+	-	-	-
45	Va	:	11	10	8	459	451	10
		:	+	+	+	-	-	-

L'utilisation de sources de carbone à des fins d'identification selon l'invention peut être faite en cupules miniaturisées (plaques de microtitration par exemple).

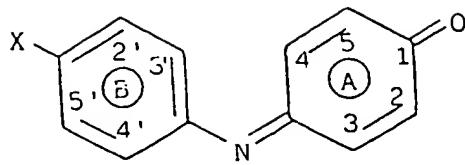
Par conséquent, les réactifs selon l'invention peuvent être utilisés pour la détection de micro-organismes dans toutes sortes d'échantillons biologiques, tels que fluides corporels (sang, urine, liquide céphalo-rachidien, etc...), produits alimentaires, eau, produits pharmaceutiques, cosmétiques, etc...

De manière similaire à l'antibiogramme selon l'exemple 3, l'invention peut être utilisée pour effectuer un antifongigramme, auquel cas on utilise une pluralité de réactifs selon l'invention, différant les uns des autres uniquement par l'ajout d'anti-fongiques respectivement différents.

#### 50 Revendications

1 - Réactif pour la détection de micro-organismes, comprenant un milieu réactionnel en phase aqueuse, un marqueur dont une émission lumineuse est modifiable en conséquence du développement du micro-organisme introduit dans le milieu réactionnel, caractérisé en ce que le marqueur est un composé chimique répondant à la formule suivante, ou sa forme anionique :

5

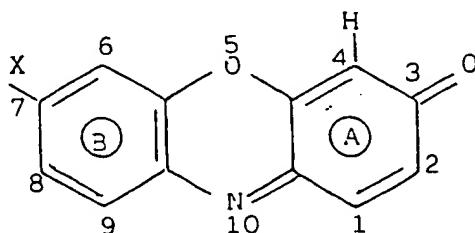


dans laquelle :

- 10 - les positions (2'), (4') et (5') sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide, cyano,
- 15 - un groupement oxy relie entre elles les positions (3') et (4)
- les positions (2), (3) et (5) sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide et cyano, ou les positions (2) et (3) appartiennent en commun au noyau (A) et à un noyau insaturé
- X est une fonction hydroxyle ou amine.
- 2 - Réactif pour la détection de micro-organismes, comprenant un milieu réactionnel en phase aqueuse, un marqueur dont une émission lumineuse est modifiée en conséquence du développement du micro-organisme introduit dans le milieu réactionnel, caractérisé en ce que le marqueur est un composé chimique répondant à la formule suivante, ou sa forme anionique

25

30



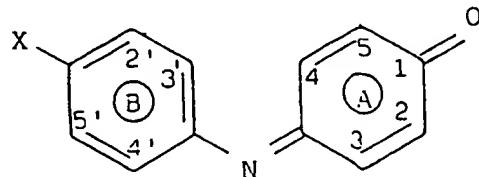
- 35 - dans laquelle les positions (6, 8, 9) sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, amide et cyano.
- dans laquelle les positions (1) et (4) sont occupées chacune par un atome ou substituant choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène, le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide et cyano ; ou les positions (1) et (2) appartiennent en commun au noyau (A) et à un noyau insaturé
- X est une fonction hydroxyle ou amine.
- 3 - Réactif pour la détection de micro-organismes, comprenant un milieu réactionnel en phase aqueuse, un marqueur dont une émission lumineuse est modifiable en conséquence du développement du micro-organisme introduit dans le milieu réactionnel, caractérisé en ce que le marqueur est la résorufine, l'orcirufine, ou la forme anionique de ces composés chimiques.
- 4 - Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le milieu réactionnel contient également une source de carbone.
- 5 - Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le pH du milieu réactionnel est compris entre 6,0 et 8,0.
- 50 6 - Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'indicateur est contenu dans le milieu réactionnel, à raison de 0,01 mg/l à 100 mg/l, et de préférence de 1 à 10 mg/l.
- 7 - Ensemble d'identification d'un micro-organisme, comprenant une pluralité de réactifs selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, différant les uns des autres uniquement par des sources de carbone respectivement différentes.
- 55 8 - Ensemble pour l'obtention d'un antibiogramme, comprenant une pluralité de réactifs selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, différant les uns des autres uniquement par l'ajout d'antibiotiques respectivement différents.

9 - Ensemble pour l'obtention d'un antifongigramme, comprenant une pluralité de réactifs selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, différant les uns des autres uniquement par l'ajout d'anti-fongiques respectivement différents.

10- Procédé de détection de micro-organismes, consistant à mettre en présence undit micro-organisme avec un milieu réactionnel en phase aqueuse contenant au moins une source de carbone et un marqueur dudit micro-organisme, à incuber le milieu réactionnel avec ledit micro-organisme, de manière à modifier une émission lumineuse dudit marqueur, et à observer ladite caractéristique lumineuse pendant ou après incubation, caractérisé en ce que le marqueur est un composé chimique répondant à la formule suivante, ou sa forme anionique :

10

15



dans laquelle :  
 20 - les positions (2'), (4') et (5') sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide, cyano,  
 25 - un groupement oxy relie entre elles les positions (3') et (4)  
 - les positions (2), (3) et (5) sont occupées chacune par un atome d'hydrogène ou un substituant choisi dans le groupe comprenant le fluor, le chlore, le brome, des substituants alkyle, alkoxy, carboxylate, carboxylique, amide et cyano, ou les positions (2) et (3) appartiennent en commun au noyau (A) et à un noyau insaturé  
 - X est une fonction hydroxyle ou amine.

11 - Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'incubation est effectuée pendant un temps compris entre 1 minute et 7 jours, à une température de 20 °C à 65 °C.

12 - Procédé selon la revendication 10, et selon lequel on met en contact un échantillon susceptible de contenir le micro-organisme à détecter et le milieu réactionnel, caractérisé en ce que l'échantillon est prélevé sur l'un des fluides corporels suivants, à savoir du sang, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien.

13 - Procédé selon la revendication 10, et selon lequel on met en contact un échantillon susceptible de contenir le micro-organisme à détecter et le milieu réactionnel, caractérisé en ce que l'échantillon est prélevé sur l'un des produits suivants, à savoir produits alimentaires, eau, produits pharmaceutiques, cosmétiques.

40

45

50

55



RAPPORT DE RECHERCHE  
EUROPEENNE

EP 90 42 0453

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
A	EP-A-0 286 434 (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CO.) -----		C 12 Q 1/04 C 12 Q 1/18 C 07 D 265/38
A	J. CHEM. TECHN. BIOTECHNOL., vol. 34B, 1984, pages 3-12; S.D. ROLLER et al.: "Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria" -----		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C 12 Q
<p>Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
La Haye	14 janvier 91	CARTAGENA Y ABELLA P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X: particulièrement pertinent à lui seul		E: document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	
Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D: cité dans la demande	
A: arrrière-plan technologique		L: cité pour d'autres raisons	
O: divulgation non écrite		.....	
P: document intercalaire		.....	
T: théorie ou principe à la base de l'invention		&: membre de la même famille, document correspondant	